



INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO, NA EXCREÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E NA PRODUÇÃO DE CIANOTOXINAS POR *RAPHIDIOPSIS BROOKII* (CYANOBACTERIA).

Bicho, M.S.¹, Giroldo, D.¹, Yunes, J.S.², De La Rocha, S.², Melcher, S.S.³, Sant'anna C.L.³, Silveira S.B.¹, Comin, R.¹, & A.A.H.Vieira⁴

¹ Lab. Limnologia - DCMB & ²Unidade de Pesquisas em Cianobactérias - FURG - RS³ Instituto de Botânica - Seção Ficologia - Secretaria Meio Ambiente - São Paulo - SP⁴ Departamento de Botânica - Universidade Federal de São Carlos - SP- Brasilmicho_01@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Raphidiopsis (Cyanobacteria) é caracterizado pela ausência de bainha mucilaginosa evidente, filamentos solitários flutuantes com uma ou ambas as extremidades do tricoma atenuadas e presença de acinetos aliada à ausência de heterocistos. A linhagem utilizada neste projeto foi isolada três meses depois de uma floração tóxica de *Raphidiopsis brookii*, no lago dos Biguás, localizado no campus Carreiros da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS. O lago dos Biguás tem características eutróficas relacionadas à presença de aves que repousam em suas ilhas, promovendo um enriquecimento nutricional natural e particular de suas águas, justificando o estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na fisiologia desta cianobactéria.

O estudo da produção de cianotoxinas por *Raphidiopsis brookii* limita-se a cilindrospermopsina e deoxycilindrospermopsina (Renhui *et al.* 2001) e, mais recentemente, foram registradas neurotoxinas do tipo anatoxina e compostos homólogos em *Raphidiopsis mediterranea* (Watanabe *et al.* 2003 e Namikoshi *et al.* 2004). Não existem, até o momento, estudos relacionados com os aspectos ecofisiológicos que determinam a distribuição e ocorrência de *Raphidiopsis*, evidenciando a urgência de trabalhos que focalizem os fatores que controlam o crescimento e a produtividade das populações. A produção de polissacarídeos extracelulares, por exemplo, é um processo intimamente relacionado com a coagulação de florações, principalmente de diatomáceas, mas também de outros grupos, e que tem importantes implicações ecológicas em termos de incremento da biodiversidade funcional (Passow *et al.* 1994). justifica-se pelo pouco conhecimento das toxinas produzidas por este gênero, e também pela importância desse processo para a qualidade da água e para a saúde da população humana. O registro de linhagens tóxicas de

OBJETIVO

Este trabalho visa iniciar o estudo da influência da disponibilidade de diferentes fontes de nitrogênio, orgânicas e inorgânicas, no crescimento, na produção de cianotoxinas e na liberação de compostos orgânicos dissolvidos por *Raphidiopsis brookii*; objetivando a produção de dados que contribuam para o entendimento da distribuição e ocorrência dessa linhagem, bem como das suas funções e influências sobre os sistemas aquáticos continentais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram elaboradas culturas em duplicata de 600 mL cada, em erlenmeyers de 1 L de capacidade, testando três diferentes condições de disponibilidade de nitrogênio orgânico e inorgânico (500 mM, 1000 mM e 1500 mM). As fontes inorgânicas foram nitrato e amônio, enquanto as fontes orgânicas foram uréia e ácido úrico.

Alíquotas de 30 mL foram retiradas duas vezes por semana para a determinação de: (1) crescimento pela contagem de tricomas (câmara de Neubauer), pelo biovolume celular (medidas e correlação com sólidos geométricos) e pelo teor de clorofila-a (espectrofotometria), (2) produção de cianotoxinas por cromatografia líquida de alta performance com detecção por fluorescência (HPLC-FLD), (3) carboidratos (espectrofotometria e HPLC com detecção por amperometria pulsada) e (4) proteínas totais (espectrofotometria). Nas condições em que for observado o processo natural de formação de agregados, testes adicionais serão realizados com o objetivo de iniciar a investigação dos fatores que regulam este processo.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados referentes ao experimento com nitrato evidenciaram uma limitação do

crescimento em 500 mM a partir de 30 dias de cultivo, enquanto nas demais disponibilidades a limitação do crescimento ocorreu após 47 dias de cultivo. O crescimento foi mais bem caracterizado pelo teor de clorofila-a e biovolume celular, enquanto a contagem de tricomas não representou adequadamente a entrada na fase estacionária de crescimento. A excreção de compostos orgânicos, tanto carboidratos como proteínas, foi baixa e a taxa de excreção por célula apenas aumentou após o estabelecimento da fase estacionária de crescimento. Este resultado corrobora estudos anteriores baseados na hipótese do excesso de carbono fotoassimilado, que relaciona a ausência de divisões celulares com a manutenção do processo fotossintético na fase estacionária, gerando assim carboidratos não utilizados no processo de crescimento, desviados então para a excreção (Girollo e Vieira 2005). As toxinas liberadas por *R. brookii* são pertencentes ao grupo das toxinas paralisantes (PSPs), sendo dois tipos de saxitoxinas (saxitoxina e dc-saxitoxina) e dois tipos ainda não identificados de gonyautoxinas (GTX Vn1 e GTX Vn2). Estes resultados configuram-se como o primeiro registro da produção de PSPs em *Raphidiopsis*. O choque nutricional com amônio (cultura aclimatada a nitrato e repentinamente exposta a amônio) promoveu um menor crescimento em 1500 mM. Nas demais concentrações houve um rápido crescimento e a maior biomassa foi atingida após 15 dias. A agregação iniciou-se quando a biomassa atingiu os mais altos valores e esse processo atuou na senescência das culturas. A excreção de carboidratos e proteínas aumentou com o tempo de cultivo e pode ter contribuído com a agregação. A análise da composição e estrutura dos carboidratos excretados, ainda em andamento, pode revelar características físico-químicas que favoreçam a agregação. Os demais experimentos com as fontes orgânicas de nitrogênio estão ainda em andamento, assim como testes adicionais para iniciar a investigação da agregação, processo este de grande interesse ecológico por influenciar a senescência e coagulação de florações. Estes experimentos em andamento fornecerão dados complementares ao deste estudo e serão publicados e apresentados independentemente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Girollo, D. e Vieira, A.A.H. 2005. Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. **Journal of Plankton Research** **27**, 695-705.

Namikoshi M., Murakami T., Fujiwara T., Nagai H., Niki T., Harigaya E., Watanabe M.F., Oda T., Yamada J. e Tsujimura S. 2004. Biosynthesis and transformation of anatoxin-a in the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja and structure of three new homologues. **Chemical Research in Toxicology** **17**, 1692-1696.

Passow, U., Alldredge, A.L. e Logan, B.E. 1994. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. **Deep-Sea Research I** **41**, 335-357.

Renhui L., Carmichael W.W., Brittain S., Eaglesham G.K., Shaw G. R., Liu Y. e Watanabe M.M. 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology** **37**, 1121-1126.

Watanabe M. F., Tsujimura S., Oishi S., Niki T. e Namikoshi M. 2003. Isolation and identification of homoanatoxin-a from a toxic strain of the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja isolated from Lake Biwa, Japan. **Phycologia** **42**, 364-369.